

## PRODUCCIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS POR BACTERIAS DEL INTESTINO DE EISENIA FOETIDA (ANNELIDA: CLITELLATA: HAPLOTAXIDA).

Carmen Salvador <sup>(1)</sup>, Jacqueline Destain <sup>(2)</sup>, Maira Rojas <sup>(3)</sup>, Emilia Vásquez <sup>(1)</sup> y  
César Paz-y-Miño <sup>(3)</sup>

(1) Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Américas (UDLA) Ecuador.

(2) Service de Bioindustrie, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques Gembloux,  
Université de Liège.

(3) Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de  
las Américas (UDLA) Ecuador.

### RESUMEN

La búsqueda de biocatalizadores con aplicaciones industriales, ambientales y biomédicas se convierte en una actividad para llevar el conocimiento científico de los microbiomas al campo de las ciencias aplicadas. En esta investigación se seleccionó el tracto digestivo de la lombriz *Eisenia foetida*, para encontrar bacterias productoras de actividades enzimáticas. Además, de las diversas aplicaciones industriales que tienen los microorganismos, el conocimiento de éstos mejora la comprensión del rol que cumplen en la fisiología de la especie huésped, y los metabolitos que ellos producen constituyen una herramienta taxonómica más para la caracterización e identificación de los oligoquetos. Mediante técnicas de microbiología básica se analizó cuantitativamente las unidades formadoras de colonias (UFC) en lombrices de Bélgica y en lombrices de Ecuador; se obtuvieron cifras similares de  $2,07 \times 10^5$  UFC/g y  $2,07 \times 10^5$  UFC/g, respectivamente, esto en relación a las bacterias totales que habitan en el tubo digestivo de las lombrices colectadas en los dos sitios geográficos. Las especies encontradas para las características enzimáticas estudiadas fueron *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus glucanolyticus*, *Paenibacillus macerans* y *Bacillus licheniformis*. Estas especies parecen pertenecer a la microbiota que fue ingerida del ambiente circundante y no a la microbiota propia de la bacteria.

**Palabras Claves.-** Enzimas, Microbiota, Lombriz de tierra, actividades enzimáticas

### ABSTRACT

The search for bio-catalysts with industrial, environmental and biomedical applications has become an activity to bring the scientific knowledge of biomes onto the field of applied sciences. During this research, the digestive tract of earth worm *Eisenia foetida* was selected in order to find enzymatic activity-producing bacteria. Apart from the diverse industrial applications of microorganisms, their study helps improve the understanding of their role in the physiology of the host species. Also, their metabolites constitute an additional tool for the characterization and identification of oligochaete. By means of basic microbiology techniques, the Colony Forming Units (CFU) were quantitatively analyzed in earth worms in Belgium and in earth worms in Ecuador; similar figures of  $2,07 \times 10^5$  CFU/g and  $2,07 \times 10^5$  CFU/g were obtained, respectively. This, in relation to the total bacteria that inhabit in the digestive tube of the earth worms collected in the two geographical sites. The species found and later studied for the studied enzymatic characteristics were *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus glucanolyticus*, *Paenibacillus macerans* and *Bacillus licheniformis*. These species appear to belong to the microbiota that was ingested from the surrounding environment and not to the earth worm's very own microbiota.

**Keywords.-** Enzymes, Microbiota, Earth worm, Enzymatic activity

Recibido: Marzo de 2011  
Aceptado: Junio de 2011

## 1. INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra son consideradas como vectores para la dispersión de microorganismos del suelo y biorreactores para ciertos géneros de bacterias (14). Parece ser que esta microfauna mutualista favorece a la lombriz de tierra a digerir la materia orgánica del suelo con la ayuda del moco intestinal (3). Las comunidades microbianas del intestino de lombrices muestran una asociación más oportunista que obligada (4); esta simbiosis puede ser considerada una fuerza de conducción importante en la evolución de los metazoarios (11). Sin embargo, otros microorganismos que ingresan en el tubo digestivo no tienen esta función, sino que pueden servir de alimento y brindar un componente energético a la dieta de la lombriz (17). Los microorganismos que hacen parte posiblemente de su alimentación también desencadenan, en muchos de los casos, una actividad enzimática (1).

Se conoce que algunas de las proteasas encontradas perturban la fisiología del huésped y afectan el fenotipo de la descendencia (2). Son aún pocos los investigadores que han analizado a los microorganismos simbioses de las lombrices de tierra, sus correspondientes enzimas y la función que ambos componentes cumplen dentro de la lombriz. Entre los estudios se encuentran los realizados en *Polypheretima elongata* y *Pontoscolex corethrurus*, en los que se encontró una producción enzimática propia de la especie (9). Algunas bacterias de las lombrices secretan peroxidasas que pueden participar en la descomposición de lignina y en el proceso de humificación (4). Se conoce también que en *Eisenia foetida*, se han descrito mecanismos de activación de la producción de actividades enzimáticas, encontrándose las actividades amilasa, celobiasa, endoglucanasa y nitrato reductasa (12).

La existencia de una microfauna nativa en las lombrices de tierra es aún un tema controversial (4), se conceptúa que de los cocos, bacilos y bacterias filamentosas, estas últimas podrían ser un morfotipo perteneciente a la microfauna autóctona (15). Se sabe también que las lombrices de tierra poseen bacterias que forman un haz monofilético en el género *Acidovorax*, resultado de un ancestro bacteriano común (8). Uno de los objetivos de este trabajo fue encontrar en *Eisenia foetida*, que es una lombriz que vive sobre la superficie y está ligada a la materia en descomposición (5), nuevas bacterias autóctonas o ingeridas del medio circundante, cuyo fenotipo exprese la producción de algunas enzimas de interés industrial como son las amilasas y proteasas.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Método de cultivo de lombrices de tierra

Los individuos de *Eisenia foetida* encontrados provinieron de la Empresa Ouroboros (Vermicompost Gembloux - Bélgica) y del Vivero del Programa de Jardinería para Jubilados, del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS-Quito). Los individuos fueron mantenidos en el laboratorio CWBI (Centre Wallon des Bioindustries) de la Facultad de Gembloux y en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad de las Américas. Las lombrices fueron colocadas en una caja rectangular de plástico con una capacidad de 10 litros en un suelo orgánico húmedo con una temperatura entre 15°C y 25°C. El medio en el que fueron conservadas en Bélgica se compone de estiércol de caballo, tierra de superficie y desechos vegetales en proporciones de 1:1:1. En el Ecuador, fueron mantenidas con tierra de superficie y desechos vegetales en proporciones de 2:1 respectivamente.

### 2.2. Disección de lombrices de tierra y recolección del tubo digestivo.

Se lavó las lombrices con agua destilada, etanol al 45% durante 5 segundos, y se las colocó en un congelador a -0 °C, durante 3 minutos para proceder fácilmente con la disección. Se extrajo el tubo digestivo de la lombriz y se lo colocó en 1ml de tampón fosfato de sodio

( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ) a pH 5.8. En el Ecuador, el tubo digestivo fue colocado en agua destilada estéril; esta mezcla fue colocada en el vórtex durante 15 segundos.

Para evidenciar si la actividad es propia de la lombriz o producto del metabolismo bacteriano, se filtró el contenido del tubo digestivo usando una membrana de  $0.45\ \mu\text{m}$  e incubando  $10\ \mu\text{l}$  de estos extractos en medios gelificados específicos en los que se adicionó  $0.2\text{g/l}$  de cloranfenicol. Para la detección de microorganismos productores de enzimas en los jugos del tubo digestivo, se retiró el cloranfenicol del medio gelificado con el sustrato específico y el extracto del tubo digestivo fue colocado sin ser filtrado. Para determinar las actividades enzimáticas existentes en el extracto filtrado, se dejaron las cajas 6 horas a  $30^\circ\text{C}$  y 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , a las cajas que habían sido inoculadas con el extracto no filtrado.

### **2.3. Contaje de la microflora del sistema digestivo de Eisenia foetida.**

La cantidad de bacterias fue analizada con la técnica de diluciones sucesivas. Éstas fueron realizadas tomando  $1.5$  gramos de extracto de tubo digestivo de lombriz en  $1\text{ml}$  de agua peptonada; en cambio, en Ecuador se lo colocó en  $1\text{ml}$  de agua destilada, de esta solución, se tomaron  $25\ \mu\text{l}$  y se colocaron en un tubo de ensayo que contenía  $975\ \mu\text{l}$  de agua peptonada o destilada. A continuación, se tomaron por duplicado  $100\ \mu\text{l}$  que fueron mezclados en  $900\ \mu\text{l}$  de agua peptonada (destilada-Ecuador). De esta manera obtuvimos 3 diluciones en base 10, que fueron sembradas en medios PCA (Plate Count Agar. Difco, Francia), colocando 3 repeticiones por cada dilución.

Para reconocer a las bacterias esporulantes, se tomaron las diluciones anteriores y se colocaron en baño María a  $80^\circ\text{C}$  durante 10 minutos, posteriormente, se pusieron en agua fría y se tomó  $100\ \mu\text{l}$  de cada una para sembrarlas, usando un asa de Drigalsky.

### **2.4. Aislamiento, purificación y selección de las colonias.**

Una vez establecidas las bacterias totales, se aisló cada una de las cepas en medio PCA en el que se agregó extracto de levadura (en la misma cantidad que la peptona existente en el medio selectivo), se tomó cada colonia, se la sembró en el Caldo nutritivo (Difco, Francia) y se evaluó la pureza de las cepas al microscopio, para sembrarlas nuevamente en medio PCA; se tomaron las colonias aisladas y se sembraron en las cajas petri que contenían los dos medios selectivos en estudio, éstas se incubaron durante 24 horas a  $30^\circ\text{C}$ . Para establecer la existencia de las actividades enzimáticas, se analizó la presencia-ausencia de un halo alrededor de la muestra.

### **2.5. Medios de Cultivo**

Los medios creados y estandarizados se mencionan a continuación: Medio Amilasa. En un Erlenmeyer de  $1000\text{ ml}$ , se colocó  $15\text{ g}$  de almidón (Remy),  $15\text{ g}$  de agar,  $7\text{ g}$  de peptona, y se aforó con agua destilada. Se agitó a velocidad media con el fin de disgregar las partículas de almidón. Medio Proteasa.- Se esterilizaron en una botella  $10.5\text{ g}$  de leche en  $350\text{ ml}$  de agua destilada, esta solución se colocó en una mezcla que había sido preparada previamente, añadiendo  $7\text{ g}$  de peptona y  $15\text{ g}$  de agar en  $600\text{ ml}$  de agua destilada.

Los controles positivos empleados para medir la degradación y establecer el funcionamiento adecuado del medio fueron las enzimas comerciales Amilasa (SIGMA EC 3.2.1.1 Type: VIII-A) y Papayina (Microbelcaps, Liège, Belgique- $35.000\text{ u/g}$ ). Para la preparación de las enzimas, se colocó  $0.5\text{ g}$  de la enzima comercial a emplearse como control positivo, en  $10\text{ ml}$  de agua destilada. Los medios estudiados se tornaron más claros, formaron un típico halo de degradación si existía la presencia actividades enzimáticas. La atmósfera de incubación fue aerobia.

### **2.6. Identificación de microorganismos potenciales**

Se procedió a la identificación mediante la tinción Gram, prueba catalasa y sistema API 50 CHB/E(Biomeriux, Marcy l'Etoile, Francia). Los resultados fueron analizados en el Api Web - Biomeriux.

## 2.7. Análisis Estadístico

Se empleó el análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) para comparar las medias entre los tratamientos correspondientes a degradación del almidón y de las proteínas y se empleó el intervalo de confianza o T pareada, para el análisis de la diferencia de medias en el caso de los dos tratamientos. Se seleccionó la actividad que menos variaciones presentó a nivel de degradación de las colonias estudiadas, para confrontar la degradación del sustrato dada por las diferentes cepas. Se colocó como hipótesis nula que no existen diferencias en la degradación bacteriana de proteínas y como hipótesis alternativa que existen diferencias en la degradación bacteriana de proteínas. Se empleó también un análisis de varianza de 1 factor.

Se estudió el coeficiente de variación de los sustratos de proteína y almidón. Se consideró un valor de significancia de  $p < 0,05$ . Se empleó el software SPSS v14, Massachusetts, USA, para estos fines.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Contaje de la microbiota total y microbiota esporulada en *Eisenia foetida* belga y ecuatoriana.

En relación a las bacterias totales, en el tubo digestivo de *Eisenia foetida* (Belga) se encontró una Media aritmética de  $2,9 \times 10^5$  UFC/ g, en medio PCA utilizando tampón fosfato y en *Eisenia foetida* (Ecuador) se encontró una Media aritmética de  $2,07 \times 10^5$  CFU/ g, empleando agua destilada. Estos resultados son análogos.

En relación a las bacterias esporulantes se encontró una Media de  $1,3 \times 10^5$  CFU/ g en tampón fosfato y una Media aritmética de  $1,1 \times 10^4$  CFU/g en agua destilada. Esto significa que la mitad de la microbiota total de *Eisenia foetida* (Belga) es esporulante, a diferencia de la microbiota de *Eisenia foetida* (Ecuador) que tiene 10 veces menor porcentaje de microorganismos esporulantes en relación con *Eisenia foetida* (Belga). Ver Tabla 1.

**Tabla 1.** Microbiota total de *Eisenia foetida* colectada en Bélgica y en Ecuador.

| Bacterias en <i>Eisenia foetida</i> | Número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) Bélgica | Número de Unidades formadoras de Colonia (UFC) Ecuador |
|-------------------------------------|--|--|
| Bacterias Totales                   | $2.9 \times 10^5$ UFC/g                                | $2.0 \times 10^5$ UFC/g                                |
| Bacterias Esporuladas               | $2.3 \times 10^5$ UFC/g                                | $1.1 \times 10^4$ UFC/g                                |

### 3.2. Identificación de actividades enzimáticas

De las 15 cajas (3 repeticiones, 45 cajas en total), inoculadas con el extracto del tubo digestivo, que contenían los 2 sustratos en estudio, se encontraron actividades en los jugos digestivos de la lombriz a partir de las 6 horas. Las actividades amilasa y proteasa se encontraron tanto en el jugo digestivo filtrado como en el no filtrado. No existieron diferencias en la degradación de los sustratos, el promedio del tamaño.

Sin embargo, al emplear el coeficiente de variación para determinar las diferencias internas de degradación entre ensayos, se observó que este es de 17,1 para el almidón, mientras que el coeficiente de variación de proteínas es de 9,56.

### 3.3. Microbiota encontrada

Las cepas identificadas mediante el test bioquímico Api 50 CHB fueron *Bacillus circulans* (PCPP4-IIB), *Paenibacillus glucanolyticus* (B-IIB), *Paenibacillus macerans* (Cap1-IIB), *Bacillus licheniformis* (A30.1-IIB) y *Bacillus subtilis* (Souche 2). El promedio del tamaño del halo de cada cepa bacteriana y el análisis de varianza de la degradación encontrada, se presenta en la Tabla 2 y Tabla 2.1.

**Tabla 2.** Promedio del tamaño del halo de cada cepa bacteriana.

| Nombre de la Bacteriana             | Cuenta | Suma | Promedio/centímetros | Varianza   |
|-------------------------------------|--------|------|----------------------|------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i>       | 15     | 67.7 | 4.513333333          | 0.20266667 |
| <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> | 15     | 87   | 5.8                  | 0.08714286 |
| <i>Paenibacillus macerans</i>       | 15     | 62.8 | 4.186666667          | 0.26552381 |
| <i>Bacillus circulans</i>           | 15     | 63.5 | 4.233333333          | 0.15809524 |
| <i>Bacillus subtilis</i>            | 15     | 80.6 | 5.373333333          | 0.2092381  |

**Tabla 2.1.** Análisis de varianza de la degradación encontrada para cada cepa bacteriana.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F           | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------|--------------|----------------------|
| Entre grupos              | 31.58853333       | 4                  | 7.897133333               | 42.79515896 | 4.06225E-18  | 2.502656463          |
| Dentro de los grupos      | 12.91733333       | 70                 | 0.184533333               |             |              |                      |
| Total                     | 44.50586667       | 74                 |                           |             |              |                      |

## 4. DISCUSIÓN

Los métodos de medición de las actividades enzimáticas fueron simples, rápidos, sensibles y baratos en relación a métodos clásicos costosos como la cromatografía líquida y gaseosa. Pese a que la diversidad microbiana encontrada en los individuos de esta especie coincide con estudios realizados por Akpa Vincelas (15), se esperaba encontrar una diversidad bacteriana más alta en *Eisenia foetida* colectada en Ecuador por las características de megadiversidad que tiene el país. Sin embargo, la diversidad total bacteriana fue similar en los individuos colectados en Ecuador y Bélgica, esto puede indicar que la diversidad microbiana total de la especie es independiente del sitio geográfico en el que se colecta la lombriz o que *Eisenia foetida* posee un mecanismo de selección de las especies microbianas que ingiere (17). Casi la mitad de esta microbiota se encontró bajo la forma esporulada ( $1,3 \times 10^5$  CFU/g) en Bélgica, lo cual es interesante si se piensa en la aplicación industrial de los microorganismos, pues significaría que aproximadamente la mitad de las bacterias que viven en simbiosis en *Eisenia foetida* son resistentes a condiciones de estrés, lo cual a su vez facilita su manejo en el laboratorio y su reproducción en biorreactores. En cambio, en Ecuador, el número de bacterias esporulantes en los individuos analizados es de  $1,1 \times 10^4$  CFU/g. Estos valores pueden deberse a las diferencias en la metodología, como son la aplicación del tampón fosfato en los extractos del tubo digestivo, el agua peptonada en las diluciones en el caso del análisis en Bélgica, y el uso de agua destilada en Ecuador. Sobre los microorganismos encontrados, se piensa que éstos no son representativos de la verdadera diversidad del tracto digestivo de la lombriz y que debe existir una diversidad mayor en el extracto del tubo digestivo, la misma que pertenece a microorganismos que existen bajo formas no cultivables (7). Por esta razón, propondríamos que se estudie la metagenómica en el tubo digestivo de la lombriz.

Ambas actividades enzimáticas fueron encontradas en los extractos digestivos filtrados y no filtrados: por lo tanto, estas actividades pueden tener un origen intracelular y extracelular; en el caso de las amilasas encontradas en *Eisenia foetida*, se conoce que las proteasas son liberadas en el tubo digestivo de esta lombriz (12) y que muchas de las proteasas tienen un origen microbiano extracelular, responsable de la digestión (6). La presencia de estas enzimas ha sido confirmada en la lombriz de tierra en un estudio realizado por Mitsuhiro en el año 2008 (10). No existen diferencias entre los tamaños del halo de degradación de almidón y de las proteínas. Ambas actividades se encuentran en la lombriz (6,12); el coeficiente de variación muestra que la degradación del almidón tiene más variaciones y denota resultados menos continuos. Posiblemente la degradación de almidón presentó un origen intrínseco a la fisiología de la lombriz (12) y no tanto a su microbiota; en cambio, la variación de la degradación del sustrato proteínico, correspondió a un crecimiento favorable de la biomasa bacteriana, la que desencadenó una degradación más continua del sustrato. Por esta razón, se decidió identificar solamente los microorganismos relacionados con la producción de proteasas. Al estudiar esta biomasa bacteriana, se encontró que las cepas potenciales para la degradación de proteínas, según la Media Aritmética, fueron: *Bacillus subtilis* (Souche 2) y *Bacillus licheniformis* (Souche A30.1). Se empleó un intervalo de confianza para comparar la degradación de proteínas entre las dos cepas y se obtiene que, al diferir las medias entre los dos tratamientos, la degradación entre estas cepas se produce de manera distinta, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa en la que se encuentra diferencias en los niveles de degradación de proteínas producidos por las bacterias. Las especies del género *Bacillus* y *Paenibacillus*, en otros estudios como el de Zhao (16), Aira (1) y Leipner (13), también presentaron actividades proteolíticas que difieren.

Se piensa que estos microorganismos no son nativos en *Eisenia foetida*, pues se conoce que esta especie selecciona y digiere microorganismos que se encuentran en sus alimentos (17). Se han realizado estudios en las comunidades bacterianas presentes en *Eisenia foetida*, tales como los de Hyun-Jun Kim et al, 2004 (10), y no se han encontrado las especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* encontradas en este trabajo. Por lo tanto, este estudio representa una contribución de especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* encontradas en el tracto digestivo de *Eisenia foetida*, y de la presencia de actividades amilolíticas y proteolíticas en estas cepas de bacterias.

## AGRADECIMIENTOS

A José Ignacio Laquidáin por el trabajo de traducción en inglés y la revisión del texto en español y a Diego Vega por los análisis estadísticos realizados.

## REFERENCIAS

1. Aira, M., F. Monroy, and J. Dominguez. 2006. *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) activates fungal growth, triggering cellulose decomposition during vermicomposting. *Microbial Ecology* 52 (4):738-747.
2. Alexander, B., and F.G. Pries. 1989. *Bacillus glucanolyticus*, a new species that degrades a variety of  $\beta$ -Glucans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.39 (1989), 112-115.
3. Boyer, J., and L. Patrick. 2008. Biological Interactions (Fauna, ravager, parasites, microflora) in soils under crops in Reunion Island. Université de Paris 06, Francia. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=194240>
4. Brown, G., I. Barois, and P. Lavelle. 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur. J ;Soil Biol.*36 (2000) 177-198. 2000.
5. Curry, J. P., and O. Schmidt. 2006. The feeding ecology of earthworms. *Pedology*. Volume 50, Issue 6,4.January 2007,Pages 463-477.
6. Edwards, C. A., and P. Bohlen. 1996. *The Biology and Ecology of Earthworms*. *Earthworm Ecology, from Darwin to Ecology*. Chapman and Hall. pp. 309-313.

7. Gobat, J., M. Aragno, and W. Matthey. 1998. Le sol vivant. Bases de pédologie. Biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.
8. Gupta, A., Murarka, A., Campbell, P, and R. Gonzalez. 2009. Anaerobic fermentation of glycerol in *Paenibacillus macerans*: metabolic pathways and environmental determinants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009 Sep;75 (18):5871-83.
9. Hartmann, A., P. Piveteau, and P. Lemanceau. 2009. Microflore des sols et bactéries pathogènes de l'Homme. *Microbiologie du sol et de l'environnement (MSE)*. INRA, Francia. [www.inra.fr](http://www.inra.fr)
10. Kim, J. K., Shin K., Cha C.J, and H.G. Hur. 2005. Analysis of Aerobic and Culturable Bacterial Community Structures in Earthworm (*Eisenia foetida*) Intestine. *Agr.Chem.Biotechnol*. 47 (3),137-142.
11. Lattaud C., B. G. Zhang., S. Locati., C. Rouland, and P. Lavelle, 1997. Activities of the digestive enzymes in the gut and in tissue culture of a tropical geophagous earthworm, *Polypheretima elongata* (Megascolecidae). *Soil Biology and Biochemistry*. Volume 29, Issues 3-4, March-April 1997, Pages 335-339. 5th International Symposium on Earthworm Ecology.
12. Mitsuhiro, U., T. Asano., M. Nakazawa., K. Miyatake, and K. Inouye. 2008. Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted  $\alpha$ -amylases from *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 150, Issue 1, May 2008, Pages 125-130.
13. Noskin, G.A., T. Suriano., S. Collins., S. Sesler, and L. R. Peterson. 2001. *Paenibacillus macerans* pseudobacteremia resulting from contaminated blood culture bottles in a neonatal intensive care unit. *American Journal of Infection Control*. Volume 29, Issue 2, April 2001, Pages 126-129.
14. Pernice, M., W. Silke., O.Gros., R. Boucher-Rodoni, and N. Dubilier. 2007. Enigmatic dual symbiosis in the excretory organ of *Nautilus macromphalus* (Cephalopoda: Nautiloidea). *Proc Biol Sci*. 2007, May 7; 274(1614): 1143–1152.
15. Prabha Lakshmi , Indira A Jayaraaj\*, R Jeyaraaj and Prabha, M. L., I. Jayaraaj, and R. Jeyaraaj. 2007. Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida eugeniae* . *Indian Journal of Biotechnology*. Vol 6, October 2007, pp 567-569 Vol 6, Octobre 2007, pp 567-569.
16. Prakasham, R., M. Hymavathi., C. Subba Rao, S. Arepalli., J. Venkateswara Rao., P. Kennady., K Nasaruddin., J Vijayakumar., P. Sarma. 2009. Evaluation of Antineoplastic Activity of Extracellular Asparaginase Produced by Isolated *Bacillus circulans*. *Applied Biochemistry Biotechnology*.
17. Pramanik, P.,G. Ghosh., P. Ghosal, and P. Banik. 2010. Changes in microbial properties and nutrient dynamics in bagasse and coir during vermicomposting: Quantification of fungal biomass through ergosterol estimation in vermicompost. *Waste Management*, Volume 30, Issue 5, May 2010, Pages 787-79.
18. Seana, K., and D. Stahl. 2006. Transmission of Nephridial Bacteria of the Earthworm *Eisenia fetida*. *Applied and Environmental Microbiology*, January 2006, p. 769-775, Vol. 72, No. 1. University of Washington, Seattle-Washington.
19. Toyota, K., and K. Makoto. 2000. Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia foetida*. *Bio Fertil Soils* (2000) 31:189-190. Laboratory of Soil Biology and Chemistry, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan.
20. Vincelas-Akpa, M., and M. Loquet. 1995. Observation in-situ de la microflore liée au tube digestif de *Eisenia foetida andreii* (Lumbricidae). *Eur.J.Soil Biol.*, 1995,31(2),101-110.
21. Zhao, J., Pan, P.; He, J., Liu, Y., Li, D.F, and He, R.Q. 2007. *Eisenia fetida* Protease-III-1 Functions in Both Fibrinolysis and Fibrogenesis. *J Biomed Biotechnol*. 2007; 2007: 97654.
22. Zirbes, L. 2007. Ecologie chimique d' *Eisenia foetida* et son implication dans le lombricompostage. Mémoire de fin d' études en vue de l' obtention du grade de Bioingénieur en chimie et Bioindustries. Faculté Universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux-Belgique.